

University of Groningen

Onderzoeken over arvensine

Soedigdo, Raden

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1961

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Soedigdo, R. (1961). *Onderzoeken over arvensine*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Hoofdstuk VIII

SAMENVATTING EN SLOTBESCHOUWING

In dit proefschrift wordt, evenals in (48) en (49), de isolering, zuivering en karakterisering van een protease uit capucijners (*Pisum sativum* L. ssp. *arvense* (L.) A. et G.) beschreven, waarvoor reeds eerder de naam *arvensine* werd voorgesteld.

De eerste stap bij de zuivering is de bereiding van een acetonpoeder. Hierdoor wordt een uitgangsmateriaal verkregen, dat vrij is van kleurstoffen en (andere) lipiden, die zowel de zuivering als de activiteitsbepaling van het enzyme kunnen storen (Hoofdstuk III, B). Door extractie van het acetonpoeder en herhaalde isoëlectrische precipitatie en acetonfractionering kon een enzyme-preparaat worden verkregen met een 350 maal zo grote zuiverheid als het acetonpoeder (Hoofdstuk VI). Het preparaat, hoewel beslist nog niet zuiver, had bij inwerking op caseïne ongeveer een vierde van de activiteit van een gelijke gewichtshoeveelheid zuiver, kristallijn trypsine. Hierdoor is aangetoond dat de activiteit van de proteasen uit zaden van dezelfde orde van grootte is als die van de proteasen uit het maag-darmkanaal, dit in tegenstelling tot de mening van sommige onderzoekers dat de activiteit veel lager zou zijn. Het gehalte van het enzyme in ongekiemde capucijners is ten hoogste 0,05% van het totale eiwit.

Het pH-optimum van *arvensine* ligt bij pH 8,0 met caseïne als substraat.

Het enzyme bleek behalve caseïne ook andere eiwitten te kunnen splitsen, nl. runderhemoglobine, runderserumalbumine alsmede eiwitten aanwezig in de ruwe extracten van capucijners. In het geval van hemoglobine werd het natieve eiwit minstens even snel gesplitst als het door hitte gedenatureerde; serumalbumine werd alleen in gedenatureerde vorm afgebroken. Ook de trypsine-inhibitor uit sojabonen bleek in natieve toestand door *arvensine* te worden gesplitst, zelfs sneller dan caseïne. Bij de splitsing van eiwitten ontstaan grotendeels of uitsluitend peptiden, hetgeen bewijst dat *arvensine* een endopeptidase is.

Verschillende synthetische substraten werden geprobeerd. Benzoyl-argininamide, glycyl-phenylalaninamide en glycylglycine werden niet door het enzyme gesplitst. Verder is nog niets over de specificiteit bekend.

Arvensine wordt geremd door de zouten van tweewaardige metalen (Cu, Hg, Fe, Mn, Mg, Ca en Zn) in concentraties van 10^{-3} M

of lager, terwijl ferri-ionen geen invloed op de activiteit hebben. Remstoffen, die in lage concentraties met -SH-groepen reageren, zoals joodaceetamide, p-chloormercuribenzoaat en zilverionen, hadden in deze lage concentraties geen effect op het enzyme, terwijl cysteine, dat -SH-enzymen activeert, in een concentratie van 10^{-2} M duidelijk remde. Arvensine behoort dus zeker niet tot de papafnassen. Hij vertoont wel enige gelijkenis met trypsine wat betreft het pH-optimum met caseïne, het ontbreken van een melkstrekkend vermogen e.d.

De resultaten tonen aan dat het mogelijk is om een proteolytisch enzyme uit ongekiemde zaden te isoleren, en de eigenschappen daarvan te onderzoeken. Verder onderzoek, dat op het hier beschrevene kan voortbouwen, zal kunnen leiden tot nog verdere zuivering en uitgebreidere karakterisering, alsmede tot inzicht in de physiologische rol van arvensine.

SUMMARY

This thesis deals with the isolation, purification and characterization of a protease from ungerminated pea seeds, *Pisum sativum* L. ssp. *arvense* (L.) A. et G. It was possible to purify the enzyme ca 350-fold by the repeated use of isoelectric precipitation and acetone fractionation of the crude extract. The use of an acetone powder of the seeds as starting material appeared necessary as it removes most of the coloured material and other substances interfering with the purification and determination of activity. Lyophilization of an intermediate fraction was carried out in order to obtain a stable product suitable for further purification. The specific activity on casein of the most purified enzyme preparation was about a quarter of that of crystalline trypsin. Purification with ammonium sulfate was also tried, but without success.

The enzyme had its pH optimum at 8.0 when acting upon casein solubilized by heating.

Besides casein, hemoglobin and serum albumin were broken down by this enzyme. In the case of hemoglobin, the enzyme attacked the native as well as the heat - denatured form, whereas with serum albumin only the denatured protein was split to a measurable degree.

The synthetic substrates benzoyl-argininamide, glycyl-phenylalaninamide and glycyl-glycine were not hydrolyzed to a measurable extent when incubated for 3 hours with the most purified enzyme preparation at a high concentration.

The protease was strongly inhibited by divalent cations, notably Cu^{++} , Hg^{++} , Fe^{++} , Mn^{++} , Mg^{++} , Zn^{++} , and Ca^{++} , at 10^{-3} M or lower. Fe^{+++} -ions (10^{-3} M) and Ag^{+} -ions (10^{-4} M) had no significant effect. The inhibition could be reversed by addition of ethylenediamine tetra-acetic acid. This substance, however, could not restore activity after inactivation by FeCl_2 or HgCl_2 . The influence of some anions was also examined. BrO_3^- -ions (10^{-3} M) did not show any effect.

Soy bean trypsin inhibitor which appeared to be highly active against trypsin, did not only show no inhibition, but was even split by pea seeds protease.

Iodoacetamide ($3 \cdot 10^{-2}$ M), diisopropylphosphofluoridate (10^{-3} M) and p-chloromercuribenzoate (10^{-4} M) had no measurable inhibitory effect, even when the protease was preincubated with the inhibitor. On the other hand, L-cysteine (10^{-2} M), a well-known activator of -SH enzymes, had a remarkable inhibitory effect.

A comparison of the properties of this enzyme with the more

purified plant proteases described shows that it is different from papainases in many respects. It does e.g. not possess reactive-SH groups necessary for activity, does not clot milk, is inhibited by cysteine.

Qualitative experiments have shown that the products of the enzymic splitting of casein are mainly or only peptides. This provides evidence that the enzyme is of the endopeptidase type and not e.g. an aminopeptidase.

In view of the fact, that an enzyme of this type has, to our knowledge, not yet been described, we propose the name *arvensin* for it.